

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 07-246235

(43)Date of publication of application : 26.09.1995

(51)Int.Cl.

A61L 27/00

(21)Application number : 06-065661

(71)Applicant : YAMANOUCHI PHARMACEUT
CO LTD

(22)Date of filing : 09.03.1994

(72)Inventor : ISHIKAWA RETSU
KINOSHITA ATSUHIRO
ODA SHIGERU

(54) TRANSPLANTING BODY FOR OSSIFICATION

(57)Abstract:

PURPOSE: To obtain a transplanting body for forming good osteotissues by depositing bone induction factors on a carrier consisting of dimorphic calcium phosphate, thereby rapidly inducing ossification in a living body and gradually substituting the bone with neobones.

CONSTITUTION: This transplanting body for ossification includes the bone induction factors (BMP) and the dimorphic calcium phosphate (BCP). The dimorphic calcium phosphate to be used has good bioaffinity and is more preferable when the dimorphic calcium phosphate contains hydroxy apatite and β -tricalcium phosphate at ≥ 90 wt.% in total. The weight ratios of the hydroxy apatite and the β -tricalcium phosphate are within a range of 50/50 to 10/90. The bone induction factors are the recombination human bone induction factors (rhBMP) prepd. by culturing transformers (cells or microorganisms) contg. recombinant DNA including basic arrangement to code the human bone induction factors and isolating and refining the recombination human bone induction factors produced by these transformers.

*** NOTICES ***

JPO and INPIT are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

- 1.This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
- 2.**** shows the word which can not be translated.
- 3.In the drawings, any words are not translated.

DETAILED DESCRIPTION

[Detailed Description of the Invention]

[0001]

[Industrial Application]This invention relates to the transplant for osteogenesis. It is related with the transplant for osteogenesis which supports an osteoinductive factor to the carrier which consists of diphase calcium phosphate especially.

[0002]

[Description of the Prior Art]An osteoinductive factor (bone morphogenetic protein:BMP) is active protein in which act on the undifferentiated mesenchyme system cell in subcutaneous tissue or the muscular tissue, make this specialize in a chondroblast or osteoblast, and a cartilage or a bone is made to form. Although BMP was discovered as a substance in which the ectopic osteoinduction activity which exists in the cow deliming bone matrix is shown, it did not isolate purely but a concrete structure was still un-solving. However, cloning of the gene which encodes Homo sapiens BMP was carried out by the art of gene engineering, and the amino acid sequence became clear by it. a group which consists of two or more close relationship protein in which, as for Homo sapiens BMP, an amino acid sequence has homology -- it also became clear that a family was constituted and the recombination Homo sapiens osteoinductive factor (rhBMP) of many kinds has been invented [Science Vol.242, pp.1528-1534 (1988) ;P roc.Natl.Acad.Sci.USA Vol.87, pp.2220-2224 (1990) ;P rogress in Growth. Each gazette of Factor Research, Vol.1, pp.267-280(1989); Patent Publication Heisei No. 500241 [two to], Patent Publication Heisei No. 503649 [three to], Patent Publication Heisei No. 505098 [three to], WO91/18098, WO92/05199, and WO93/09229] .Production by a transformant is also performed.

[0003]Using the aforementioned BMP, the method of treating damage to a bone or a cartilage, a deficit, or malconformation is variously proposed [from], when the structure of the BMP had not been solved.

It prospers further with production of recombination Homo sapiens BMP.

Since it is very difficult to carry out the entheses of the BMP to a part independently, and to

make osteogenesis derive when using BMP, generally the entheses of the BMP is carried out to a part in the form which the carrier was made to support. This needs several days thru/or several weeks for bone derivation on the part by BMP, and it is the main purposes to stop on the part, without diffusing BMP at least in the meantime. Thus, since the entheses of the carrier for BMP is carried out to in the living body with BMP, it is required that it should have the characteristics, such as low toxicity, low carcinogenicity, and low antigenicity, without spoiling BMP activity, and also acquisition ease and to have biodegradability by a case are also desired. The transplant (JP,60-253455,A) which impregnated the ceramics material base material with BMP and a collagen carrier as already proposed art, for example, There are a constituent (the U.S. patent No. 5,171,579 specification) etc. which consist of rhBMP, porous biolysis nature polymer, and autologous blood. However, these transplants are further expected an improvement in respect of safeties, such as antigenicity, the operativity at the time of an operation, plastic surgery nature, etc.

[0004]On the other hand, using diphasic calcium phosphate (Biphasic Calcium Phosphate:BCP) was known as an inorganic sintered compact which fills up the defective parts of a gear tooth or a bone. [JP,3-94761,A; a dentistry journal, 36(2):167-177-1992] .BCP is a sintered compact of hydroxyapatite (HA) and beta-TORIKARUSHIUMU phosphate (beta-TCP). It is also checked that the crystal structure is a mixture of a hydroxyapatite (HA) phase and beta-TORIKARUSHIUMU phosphate (beta-TCP) phase by an X-ray-analysis pattern, The mixture ratio of hydroxyapatite and beta-TORIKARUSHIUMU phosphate can be adjusted and various BCP(s) can be prepared. The weight ratios of hydroxyapatite (HA) and beta-TORIKARUSHIUMU phosphate (beta-TCP) of aforementioned JP,3-94761,A are 2:8-8:2, The granular sintered compact and BCP whose sum total of both is 90 % of the weight or more have indicated it to be sufficient biocompatibility to have an active substitution operation with a bone. However, the amount of osteogenesis becomes less than the control examination which the standup of osteogenesis is quite late when BCP supplementation prosthetic dentistry material is used, and does not use BCP supplementation prosthetic dentistry material in an initial stage conversely (the aforementioned dentistry journal). Therefore, there was a fault of needing a long period of time for obtaining sufficient osteogenesis. Using this BCP as a carrier of BMP was not known at all conventionally. It was reported that BMP is spread quickly and bone derivation does not arise even if it makes the hydroxyapatite which is a constituent of BCP support BMP rather (Takaoka, et al, Clin.Orthop.234:250-254-1988).

[0005]

[Problem(s) to be Solved by the Invention]The place which did research on the carrier where this invention person has the aforementioned characteristic called for as a carrier for BMP, and which was moreover excellent in the operativity and plastic surgery nature at the time of adaptation, BCP which is not used as a carrier for BMP was the extremely outstanding carrier conventionally, and it found out that the transplant for osteogenesis which supports BMP on BCP could derive osteogenesis promptly in the living body. This

point is a surprising thing, judging from the conventional knowledge it is supposed that bone derivation does not arise in the combination of hydroxyapatite and BMP. Therefore, the purpose of this invention is the transplant which osteogenesis is derived promptly in the living body, it moreover replaces by a new bone gradually, and there is no survival of a transplant, or was stopped to the minimum and which can form a good osseous tissue, and is safe in respect of antigenicity etc., And it is in providing the transplant for osteogenesis excellent in the operativity at the time of adaptation, and plastic surgery nature.

[0006]

[Means for Solving the Problem]A transplant for osteogenesis containing an osteoinductive factor (BMP) and diphase calcium phosphate (BCP) by this invention can attain the aforementioned purpose.

[0007]Hereafter, this invention is explained in detail. A transplant of this invention is mainly used in the living body, transplanting to a part which should form a bone (a cartilage is included). If a transplant of this invention is transplanted in the living body, BMP will act on a part which carried out the entheses, and osteogenesis will be induced. BCP stops this BMP on a part, playing a role of a delivery system in which a bone of a desirable gestalt is made to form, also in itself, receives absorption gradually in the living body, and is replaced by a new bone. BCP has absorptivity in the living body originating in osseous conduction capacity and beta-TORIKARUSHIUMU phosphate phase originating in a hydroxyapatite phase, give a place of osteogenesis to BMP, and make bone induction potency reveal effectively, and. A good osseous tissue equivalent to the existing bone of living body origin which cannot be easily influenced by an infectious disease resulting from a transplant in which after that remains, etc. is made to form by being gradually replaced by a new bone. While BCP is a carrier with high safety which does not produce immunoreaction in itself, even if it does not combine with collagen etc. as a carrier of BMP, it can derive osteogenesis, and is advantageous on safety. BCP is advantageous at a point which the support nature of BMP is good and gives suitable microenvironment for the osteogenesis to BMP according to the porous description. Preparation at the time of an operation is easy for a transplant of this invention, and excellent also in operativity and plastic surgery nature.

[0008]It will not be limited especially if it is protein which has the activity in which an osteoinductive factor (BMP) which can be used by this invention acts on an undifferentiated mesenchyme system cell, this is made to specialize to chondrocyte or osteoblast, and a cartilage or a bone is made to form, and the preparing method is not limited, either. However, Homo sapiens BMP manufactured by gene modification technology at a point which can obtain material where safety on clinical [, such as immunity,] and quality were stabilized in large quantities is preferred. That is, it is the recombination Homo sapiens osteoinductive factor (rhBMP) which isolated, refined a recombination Homo sapiens osteoinductive factor which cultivated a transformant (a cell or a microorganism) containing a recombinant DNA including a base sequence which encodes the Homo sapiens osteoinductive factor, and was produced by these transformants, and prepared it. As these

Homo sapiens osteoinductive factors (rhBMP), for example, rhBMP-2, rhBMP-3, and rhBMP-heterodimers or these change objects of 4 (rhBMP-2B is said), rhBMP-5, rhBMP-6, rhBMP-7, rhBMP-8, and rhBMP -- a deficit object can be mentioned in part. These protein can be used as independent or two sorts or more of mixtures.

[0009]These rhBMP(s) can be revealed in a mammalian cell (for example, CHO cell), a microorganism (for example, Escherichia coli), or a yeast cell. Although there is rhBMP-2 as rhBMP which mass production method and a purification method have already established, other rhBMP(s) can be manufactured similarly, can be refined and can be used. [Progress in Growth Factor Research, Vol.1, pp.267-280 (1989)] .Refining rhBMP-2 already known is mature peptide which consists of several monomers from which N-terminal-amino-acid arrangement differs, and it is molecular weight about 30,000 dimer protein. Each monomer has a sugar chain of a high mannose type in Asn⁵⁶ residue.

[Abstract Sixth Interraction Symposium of the Protein Society, San Diego, CA (1992)] .

[0010]Although diphasic calcium phosphate (BCP) in particular that can be used by this invention is not limited, either, BCP which contains hydroxyapatite and beta-TORIKARUSHIUMU phosphate 90% of the weight or more in total has good biocompatibility, and it is preferred. Although hydroxyapatite has good osseous conduction capacity essentially, it is hard to be absorbed in the living body. On the other hand, beta-TORIKARUSHIUMU phosphate is absorbed in the living body, although osseous conduction capacity is low. Therefore, bone conduction nature and absorptivity in the living body of BCP can be appropriately adjusted by changing percentage of hydroxyapatite and beta-TORIKARUSHIUMU phosphate as aforementioned.

[0011]It is preferred to have the absorptivity of a grade replaced by a new bone moreover derived by BMP and fitness, BCP used by a transplant of this invention maintaining the bone conduction nature of hydroxyapatite. In BCP which has such the desirable characteristic, hydroxyapatite / beta-TORIKARUSHIUMU phosphate ratio (weight) is within the limits of 50/50 thru/or 10/90. Especially since the great portion of BCP transplanted when hydroxyapatite / beta-TORIKARUSHIUMU phosphate weight ratio became or less about 30 / 70 is absorbed in the living body and it is thoroughly absorbed by or less about 20 / 80 in the living body, it is desirable. Since residual volume of hydroxyapatite inside a new bone will increase if the aforementioned weight ratio exceeds 50/50, it becomes a cause of osteoclasts by remodeling etc., or an infectious disease, and osseous conduction capacity of hydroxyapatite will become insufficient on the other hand if it becomes less than 10/90, it is not desirable.

[0012]BCP can be prepared by a publicly known method (JP,60-25383,B, JP,60-50744,B, JP,3-94761,A, JP,3-137079,A, JP,4-2355,A, JP,5-117056,A, or JP,5-161707,A each gazette). For example, it is made to mix by an about 1100-1200 °C firing step, and hydroxyapatite and beta-TORIKARUSHIUMU phosphate are prepared.

[0013]By an aforementioned method, BCP is usually prepared as a porous-granules object. This shape of porous granules BCP can be used as a carrier of this invention transplant as

it is. Although a size in particular of a granular carrier is not restricted, 100-1000 micrometers is 400-600 micrometers especially preferably more preferably about 5 mm or less from a point of operativity at the time of preparing and transplanting a transplant, or adaptability. moreover -- from a point of providing a place of support efficiency of BMP, or osteogenesis although specific surface area in particular of a porous-granules-like carrier is not restricted, either -- desirable -- more than about $0.3 \text{ m}^2/\text{g}$ -- more -- desirable -- $0.5\text{-}1.0 \text{ m}^2/\text{g}$ -- it is $0.7\text{-}0.8 \text{ m}^2/\text{g}$ especially preferably.

[0014]BCP can also be obtained as a porosity block-like-shape Plastic solid which has predetermined shape, and this porosity block-like-shape Plastic solid can be used as a carrier of this invention transplant. It is a publicly known method, and a porosity block-like-shape Plastic solid is directly fabricated by calcination from the aforementioned hydroxyapatite and beta-TORIKARUSHIUMU phosphate, or granular BCP can be re-calcinated and it can prepare it. This porosity block-like-shape Plastic solid not only can adjust shape at the time of preparation, but is easily [post forming (at the time / Especially / of transplantation)] changeable into desired shape. What is necessary is just to adjust suitably a size and shape of a porosity block-like-shape Plastic solid according to a region of transplantation or the transplantation purpose. Although specific surface area in particular is not limited, either, it is preferred that it is the same range as the above for the same reason as the aforementioned porous-granules object.

[0015]A method in particular of making the aforementioned BCP carrier support BMP and preparing a transplant of this invention is not what is restricted, For example, a BMP solution (or suspension) in a suitable fluid can be added by methods, such as immersion, being impregnated, spraying, spreading, or dropping, to a BCP carrier, then it can dry (preferably decompression or freeze-drying), and a desired transplant can be obtained easily. It freeze-dries, after making it suitably impregnated under decompression. In any case, a method of making the whole porous part of BCP distribute BMP almost uniformly is preferred, without making the activity of BMP lose. In this way, a porous-granules-like transplant can be obtained from a porous-granules-like carrier and a porosity block-like-shape transplant can be obtained from a porosity block-like-shape carrier. A group of the aforementioned porous-granules-like transplant in the living body A suitable container of several hours or biocompatibility decomposed within several days promptly, For example, it can store on capsules (for example, a gelatine capsule, a soft capsule, etc.) and a saccate sheet (for example, gelatin film), or can wrap in same biolysis nature sheet etc., and can also be considered as a package transplant which is excellent in operativity at the time of an operation.

[0016]Before a transplant of this invention gives BMP in the shape of [above / BCP] porous granules, the rear stirrup can also be the floc of a solid which added a thickener simultaneously and was fabricated in desired shape, a semisolid, the shape of clay, paste state, or a high viscosity fluid. as a thickener -- biocompatibility and safety -- and preferably

biolysis nature, [have and] As long as desired floc can be fabricated with granular BCP, there is no restriction in particular, but. For example, a cellulose type high molecular compound, for example, hydroxypropylmethylcellulose, Hydroxypropylcellulose or carboxymethyl cellulose; Polylactic acid (PLA), Polyglycolic acid (PLG) or these copolymers (PLGA); Polylactic acid (PLA), copolymer [of polyglycolic acid (PLG), or these copolymers (PLGA) and polyethylene glycols (PEG)]; -- hyaluronic acid; -- alginic acid; -- gelatin; -- fibrin paste; or collagen can be mentioned.

[0017]It is not that to which especially a method of adding a thickener to the aforementioned porous-granules-like carrier is also restricted, For example, what is necessary is to add a thickener solution (or suspension) in a suitable fluid by methods, such as immersion, being impregnated, spraying, spreading, or dropping, to a carrier, then just to dry like a support method of the aforementioned BMP (preferably decompression or freeze-drying). It freeze-dries, after making it suitably impregnated under decompression. In any case, a method of making the whole porous part of BCP distribute a thickener almost uniformly is preferred, without making the activity of BMP lose. In this way, a floc-like transplant by this invention can be obtained.

[0018]Causing osteogenesis should have just more holding amounts of BMP of a transplant than necessary minimum BMP concentration (the minimum osteogenesis manifestation concentration). Although the amount of osteogenesis increases with an increase in BMP concentration, above a certain value, the amount of osteogenesis becomes almost fixed. Generally this amount of osteogenesis is mostly in agreement with a size (or volume which a granular transplant group occupies) of a transplant. That is, even if it increases concentration too much, a bone more than a size of a transplant is not formed.

[0019]It depends on a size and shape of a transplant for a bony size and shape which are formed by carrying out the entesis of the transplant having contained BMP of suitable concentration in principle. Therefore, the concrete mixture ratio and BMP concentration can be suitably determined according to a kind of BCP, shape, a porous grade, an application site of a transplant, a desirable osteogenesis speed, etc. For example, in preparing this invention transplant using a granular BCP carrier and rhBMP-2. rhBMP-2 -- capacity of 1 ml or more of 1microg / bone which should be formed, or a cartilage -- desirable -- 5-1, and 000microg/-- said -- it is preferred to make it support with 10-300microg/ml [said 1] quantity more preferably 1 ml.

[0020]The transplant of this invention can contain an ingredient except said. Specifically as those request ingredients, a stabilizing agent, a preservative, a solubilizing agent, a pH adjuster, or a thickener can be mentioned. Operation acceleration components, such as mineral ingredients, such as a useful additional ingredient, for example, calcium phosphate, and hydroxyapatite, a bone, or chondrogenesis cofactor, fibronectin, osteonectin, or nonantigenic IBM (insoluble bone matrix) can also be included in a bone or chondrogenesis. These request ingredients are the suitable stages of manufacturing this invention transplant, and can be suitably added by a suitable method.

[0021]A transplant of this invention may be prepared at the time of use, or may be saved under relevant conditions till after-preparation use. In order to restore a deficit of various kinds of bones or a cartilage, a transplant of this invention is the method learned by the field concerned, and can be transplanted to the affected part. That is, like a transplant known conventionally, it can apply to a living body and can apply suitably in accordance with a person's skilled in the art conventional method according to a condition of the purpose, a use, an adaptation part, and a patient, etc.

[0022]A transplant of this invention specifies substantially shape of a new bone formed as mentioned above. That is, osteogenesis arises corresponding to shape of the transplant. In a part by which the entheses was carried out, phagocytosis absorption of the BCP is gradually carried out by macrophage gathering in the circumference of a transplant, and, specifically, this invention transplant is replaced by a new bone derived by BMP. Therefore, it is desirable to fabricate a transplant of this invention along with shape which expects osteogenesis. A transplant of this invention does not have the necessity for an extraction operation after transplant surgery.

[0023]It may not only be independently used for various kinds of aforementioned transplants by this invention, but may be used for them, combining them arbitrarily. It may use combining this invention transplant and another publicly known transplant. For example, a granular transplant and/or a block-like-shape transplant by this invention are made to adhere to the circumference of an artificial implant material, and it can transplant to it. In especially application of a dentistry field, concomitant use of a granular transplant by this invention and the GTR method is effective. When carrying out the entheses of the dental implant, it is effective to also make this invention transplant adhere to a contact portion with a drilling-of-bone part. When immobilization on a part of this invention transplant, maintenance of shape, or intensity is not enough, other publicly known reinforcing members can also be used together. The Gore-Tex film or a polylactic acid film etc. which a reinforcing member uses for a film, for example, collagen membrane, and the GTR method of biocompatibility for fixing a transplant, for example, Or it is a fastener of this invention transplant and an organization (especially bone) in the living body, for example, a metal plate, a pin for synostosis, or a fixed nail, and if these reinforcing members have necessity, they can also remove surgically after osteogenesis. It may use together with other publicly known transplants, and may use.

[0024]

[Example]Hereafter, although an example explains this invention still more concretely, these do not limit the range of this invention.

As a preparation BCP carrier of Example 1 (1) transplant, Granular BCP (specific surface area: specific gravity: particle diameter: 420-590micrometer; 3.1; 0.076m²/g; product made from NGK Spark Plug KK) which made it mix by a firing step (calcination temperature of 1150 **), and manufactured beta-TORIKARUSHIUMU phosphate 80% and hydroxyapatite 20% is used, As BMP, the arginine (0.5M) / L-histidine (10mM) solution of rhBMP-2

provided by Yamanouchi Pharmaceutical (pH 6.5) were used. Freeze-drying was performed and the granular transplant was obtained, after making rhBMP-2 solution (loadings of rhBMP-2: 50microg and 10microg) immerse about 700micro of BCP granulation I under decompression for about 1 hour. Two kinds of this transplant was put into the gelatine capsule, and it saved at -20 ** till implantation test implementation.

[0025](2) Skin incision was put in behind the osteogenesis examination Wistar system male rat (7-week old) (each five groups), and transplantation embedding of the capsule in which the transplant prepared above (1) entered in the hypodermic loose connective tissue was carried out. The capsule which encloses and contains as control only the BCP granulation which is not supporting rhBMP-2 was transplanted similarly. The regions-of-back skin was carefully exfoliated after three-week progress from transplantation, the transplantation thing was taken out as a lump, formalin fixation was performed promptly, and roentgenography was performed after that. a connoisseur -- the deliming paraffin section was produced in accordance with the method, the hematoxylin and eosin stain was performed, and it observed with the optical microscope.

[0026](3) By the group which carried out the enthesi of the transplant which did 50microg combination of result rhBMP-2, formation of the bone Mr. organization was observed in the example of all [five example]. In almost all the cases of a bone Mr. organization, it was observed as a new osseous tissue which has the lamellae Mr. structure which followed the group spherically formed focusing on the cell and group of the small bone Mr. organization. This microphotograph of one example is shown in drawing 1. Although formation of the bone Mr. organization same in some the BCP granulation center section as the above was seen in one example among five examples by the group which carried out the enthesi of the transplant which did 10microg combination of rhBMP-2, formation of the clear bone Mr. organization was not accepted in other four examples. In the control group, formation of the clear bone Mr. organization was not accepted, but the polynuclear giant cell was observed for many cells in BCP granulation by the circumference of BCP granulation. By the above-mentioned examination, the group of a small bone Mr. organization is mainly observed in the granulation center section, Since the new osseous tissue which specialized in the equivalent part between granulation which followed some of the group comparatively was observed, when the porosity transplant of this invention is transplanted, a spherical, first small bone Mr. organization is considered that it was formed in the inside of a transplant and the osseous tissue which specialized in the circumference further was formed after that. In the above-mentioned ectopic osteoinduction model, the above osteogenesis was observed only three weeks after transplantation, and it was checked that it is moreover low inflammation in the living body. Therefore, this invention transplant derived osteogenesis promptly in the living body, and, moreover, replaced it by the new bone gradually, and survival of the transplant could be lost thoroughly, or it could stop to the minimum, the good osseous tissue could be formed, and, moreover, the safe thing was shown in respect of antigenicity etc. The granular transplant prepared in Example 1 (1) can also be filled up and

applied to the lacking part of the alveolar bone produced by periodontosis. The GTR method may be used together and the aforementioned granular transplant may be fixed. [0027] To the cylindrical porosity BCP block fabricated according to the shape of a bone deficit of performing Example 2 (1) transplantation, the arginine (0.5M)-L-histidine (10mM) solution (pH 6.5) of rhBMP-2 is made immersed under decompression in the quantity of 1 ml of 100microg/BCP blocks of rhBMP-2, it freeze-dries continuously, and a block-like-shape transplant is prepared. In this way, the obtained block-like-shape transplant can be filled up and applied to a bone lacking part, and this block-like-shape transplant and a residual bone may be further fixed with a metal plate.

(2) Freeze-dry by making the same BCP granulation as Example 1 (1) immerse under decompression of the solution containing rhBMP-2 and atelocollagen, and prepare a granular transplant.

(3) the polylactic acid (molecular weight 650)-polyethylene-glycol (molecular weight 200) block copolymer (PLA-PEG) which is viscous after making the same BCP granulation as Example 1 (1) immerse the solution containing rhBMP-2 and making it dry it -- in addition, prepare a high viscosity gel transplant.

(4) Prepare a clay-like transplant by the same operation as said Example 2 (3) except replacing with PLA-PEG and using carboxymethyl cellulose.

[0028]

[Effect of the Invention] this invention transplant derives osteogenesis promptly in the living body, moreover, replaces it by a new bone gradually, can eliminate survival of a transplant thoroughly, or can suppress it to the minimum, can form a good osseous tissue, is safe in respect of antigenicity etc., and, moreover, excellent also in the operativity and plastic surgery nature at the time of adaptation. Therefore, in order to restore the deficit of various kinds of bones or a cartilage caused by a trauma, the illness, or the congenital defect, it is applicable to the affected part by the method learned by the field concerned. When this invention transplant is transplanted in the living body, pathogenic nature is low excellent in biocompatibility. The continuity of a newly born bone and the existing bone in the living body is also good, and restoration of a bone or a cartilage is attained in the automatically near state. Can apply this invention transplant to various kinds of fields, and For example, traumata, such as fracture, Restoration of the deficit part of the bone by **** accompanying the operation of diseases, such as a tumor or inflammatoriness, denaturation, or a necrotic bone disease, brain surgery, or an orthopedics operation, etc., or a cartilage, Formation of the bone in the circumferences of the artificial implant, such as promotion of recovery of various fracture, an artificial joint, an artificial bone, or a dental implant, It is suitable for restoration of supplementation of the bone in supplementation of the bone in the orthopedics fields, such as promotion of adherence at the time of artificial implant use, spine-fusion promotion, and elongation of leg, reproduction of a cartilage, reconstruction of a joint, and the plastic surgery field, or a cartilage or the bone in a dentistry field, a cartilage, or cement, increase of the bone for implant use, etc.

[0029]A granular transplant and a floc transplant among this invention transplants, Restoration of the small-scale deficit of especially a bone or a cartilage, the promotion of recovery of various fracture, or the bone in a dentistry field, Restoration of a cartilage or cement, the supplement of the bone for implant use, etc., It is advantageous to use the block-like-shape transplant fabricated to the bone deficit in a bone deficit large-scale on the other hand with high usefulness, the part which needs fixed intensity, or the part for which maintenance of specific shape is needed to the bone (cartilage) deficit with easy immobilization of a transplant.

[Translation done.]

* NOTICES *

JPO and INPIT are not responsible for any
damages caused by the use of this translation.

1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
2. **** shows the word which can not be translated.
3. In the drawings, any words are not translated.

CLAIMS

[Claim(s)]

[Claim 1] A transplant for osteogenesis containing an osteoinductive factor and diphase calcium phosphate.

[Claim 2] The transplant for osteogenesis according to claim 1 whose weight ratios of those hydroxyapatites and beta-TORIKARUSHIUMU phosphate diphase calcium phosphate contains hydroxyapatite and beta-TORIKARUSHIUMU phosphate 90% of the weight or more in total, and are 50:50-10:90.

[Claim 3] The transplant for osteogenesis according to claim 1 or 2 which is the recombination Homo sapiens osteoinductive factor (rhBMP) produced by transformant containing a recombinant DNA in which an osteoinductive factor includes a base sequence which encodes the Homo sapiens osteoinductive factor.

[Translation done.]

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平7-246235

(43) 公開日 平成7年(1995)9月26日

(51) Int.Cl. ⁹	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
A 6 1 L 27/00	G			
	F			

審査請求 未請求 請求項の数3 F D (全 7 頁)

(21) 出願番号	特願平6-65661	(71) 出願人	000006677 山之内製薬株式会社 東京都中央区日本橋本町2丁目3番11号
(22) 出願日	平成6年(1994)3月9日	(72) 発明者	石川 烈 東京都文京区湯島1-5-45 東京医科歯科大学歯学部内
		(72) 発明者	木下 淳博 東京都文京区湯島1-5-45 東京医科歯科大学歯学部内
		(72) 発明者	小田 茂 東京都文京区湯島1-5-45 東京医科歯科大学歯学部内
		(74) 代理人	弁理士 森田 憲一 (外1名)

(54) 【発明の名称】 骨形成用移植体

(57) 【要約】

【目的】 骨形成用移植体を提供する。

【構成】 骨誘導因子 (BMP) と二相性リン酸カルシウム (BCP) とを含んで構成される。

【効果】 生体内で速やかに骨形成を誘導し、新生骨に徐々に置換し、移植体の残存を完全に無くするかあるいは最小限に抑え、良好な骨組織を形成することができ、抗原性等の点で安全で、適応時の操作性及び整形性にも優れている。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 骨誘導因子と二相性リン酸カルシウムとを含むことを特徴とする、骨形成用移植体。

【請求項2】 二相性リン酸カルシウムが、ヒドロキシアパタイトと β -トリカルシウムホスフェートとを合計で90重量%以上含み、それらのヒドロキシアパタイトと β -トリカルシウムホスフェートとの重量比が50:50~10:90である、請求項1に記載の骨形成用移植体。

【請求項3】 骨誘導因子が、ヒト骨誘導因子をコードする塩基配列を含む組換えDNAを含有する形質転換体によって産生された組換えヒト骨誘導因子(rhBMP)である、請求項1又は2に記載の骨形成用移植体。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、骨形成用移植体に関する。特に、二相性リン酸カルシウムからなる担体に骨誘導因子を担持してなる骨形成用移植体に関する。

【0002】

【従来の技術】骨誘導因子(bone morphogenetic protein:BMP)は、皮下組織又は筋組織内の未分化間葉系細胞に作用して、これを軟骨芽細胞又は骨芽細胞に分化させ、軟骨又は骨を形成させる活性タンパク質である。BMPは、ウシ脱灰骨基質中に存在する異所性骨誘導活性を示す物質として発見されたが、純粋に単離されず、具体的な構造は未解明のままであった。しかし、遺伝子工学の技術により、ヒトBMPをコードする遺伝子がクローニングされ、アミノ酸配列が明らかになった。また、ヒトBMPは、アミノ酸配列が相同性を有する複数の近縁タンパク質からなる一群のファミリーを構成することも判明し、多数の種類の組換えヒト骨誘導因子(rhBMP)が創製されてきた〔Science Vol. 242, pp. 1528-1534 (1988); Proc. Natl. Acad. Sci. USA Vol. 87, pp. 2220-2224 (1990); Progress in Growth Factor Research, Vol. 1, pp. 267-280 (1989); 特表平2-500241号、特表平3-503649号、特表平3-505098号、WO91/18098、WO92/05199、WO93/09229の各公報〕。また、形質転換体による生産も行われている。

【0003】前記のBMPを利用して、骨又は軟骨の損傷、欠損あるいは形成不全等の治療を行う方法は、そのBMPの構造が未解明であった頃から種々提案されており、組換えヒトBMPの生産に伴って更に盛んになっている。BMPを利用する際には、BMPを単独で局所に埋植して骨形成を誘導させることが極めて困難であるので、一般的には、BMPを担体に担持させた形で局所に埋植する。これは、BMPによる局所での骨誘導には数

日ないし数週間が必要であり、少なくともその間にBMPを拡散させずにその局所に留めることが主要な目的である。このように、BMP用担体はBMPと共に生体内に埋植されるので、BMP活性を損なわずに、低毒性、低発癌性及び低抗原性等の特性を有することが要求され、更に入手容易性や、場合により生分解性を有することも望まれる。既に提案されている技術としては、例えば、セラミックス材料支持体にBMPとコラーゲン担体とを含浸させた移植体(特開昭60-253455号公報)や、rhBMPと多孔性生体分解性ポリマーと自家血とからなる組成物(アメリカ特許第5,171,579号明細書)等がある。しかし、これらの移植体は抗原性等の安全性、手術時の操作性、整形性等の点で更に改善が望まれるものであった。

【0004】一方、歯や骨の欠損部分を補填する無機焼結体として、二相性リン酸カルシウム(Biphasic Calcium Phosphate:BCP)を用いることが知られていた〔特開平3-94761号公報; 歯科ジャーナル, 36(2):167-177, 1992〕。BCPは、ヒドロキシアパタイト(HA)と β -トリカルシウムホスフェート(β -TCP)との焼結体である。その結晶構造はX線解析パターンによってヒドロキシアパタイト(HA)相と β -トリカルシウムホスフェート(β -TCP)相との混合体であることも確認されており、更に、ヒドロキシアパタイトと β -トリカルシウムホスフェートとの混合比を調節して種々のBCPを調製することができる。前記の特開平3-94761号公報は、ヒドロキシアパタイト(HA)と β -トリカルシウムホスフェート(β -TCP)との重量比が2:8~8:2で、両者の合計が90重量%以上である顆粒状焼結体・BCPが、十分な生体親和性と、骨との活発な置換作用を有していることを記載している。しかし、BCP補填補綴材を用いると骨形成の立ち上がりがかかり遅く、初期段階ではBCP補填補綴材を用いていないコントロール試験よりも骨形成量が速に少なくなる(前記の歯科ジャーナル)。従って、十分な骨形成を得るには長期間を必要とするという欠点があった。なお、このBCPをBMPの担体として用いることは従来全く知られていなかった。むしろ、BCPの構成成分であるヒドロキシアパタイトにBMPを担持させても、BMPが急速に拡散して骨誘導が生じないことが報告されていた(Takaoka, et al, Clin. Orthop. 234:250-254, 1988)。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】本発明者は、BMP用担体として求められる前記の特性を有し、しかも適応時の操作性や整形性に優れた担体に関する研究を行ったところ、従来はBMP用担体として使用されたことのないBCPが極めて優れた担体であると共に、BCP上にBMPを担持してなる骨形成用移植体は生体内で速やかに

骨形成を誘導することができることを見出した。この点は、ヒドロキシアパタイトとBMPとの組み合わせでは骨誘導が生じないとする従来の知見から判断すると、驚くべきことである。従って、本発明の目的は、生体内で速やかに骨形成を誘導し、しかも新生骨に徐々に置換し、移植体の残存が無い或は最小限に抑えられた、良好な骨組織を形成し得る移植体であって、抗原性等の点で安全で、しかも適応時の操作性、整形性に優れた骨形成用移植体を提供することにある。

【0006】

【課題を解決するための手段】前記の目的は、本発明による、骨誘導因子(BMP)と二相性リン酸カルシウム(BCP)とを含むことを特徴とする、骨形成用移植体によって達成することができる。

【0007】以下、本発明を詳細に説明する。本発明の移植体は、主に生体内で骨(軟骨を含む)を形成すべき部位に移植して使用する。本発明の移植体を生体内に移植すると、埋植した局所でBMPが作用して骨形成を誘発する。BCPは、このBMPを局所に留め、望ましい形態の骨を形成させるデリバリー・システムの役割を果たしながら、それ自体も徐々に生体内で吸収を受け、新生骨に置換される。BCPは、ヒドロキシアパタイト相に由来する骨伝導性と β -トリカルシウムホスフェート相に由来する生体内吸収性を併せもち、BMPに骨形成の場を与え、骨誘導能を有効に発現させると共に、徐々に新生骨と置換されることにより、その後の残存する移植体に起因する感染症等の影響を受けにくい生体由来の既存の骨と同等の良好な骨組織を形成させる。また、BCPは、それ自体免疫反応を生じない安全性の高い担体であると同時に、BMPの担体としてコラーゲン等と組み合わせなくても骨形成を誘導することができ、安全性の上で有利である。更に、BCPはその多孔性の性状により、BMPの担持性が良好であると共に、BMPにその骨形成に好適な微小環境を付与する点で有利である。また、本発明の移植体は手術時の調製が容易であり、操作性及び整形性にも優れている。

【0008】本発明で使用するこのできる骨誘導因子(BMP)は、未分化の間葉系細胞に作用して、これを軟骨細胞や骨芽細胞へ分化させ、軟骨又は骨を形成させる活性を有するタンパク質であれば特に限定されず、その調製方法も限定されない。しかし、免疫性等の臨床上の安全性及び品質の安定した材料を大量に入手することができる点で遺伝子組換え技術により製造されたヒトBMPが好ましい。すなわち、ヒト骨誘導因子をコードする塩基配列を含む組換えDNAを含有する形質転換体(細胞又は微生物)を培養し、それら形質転換体によって産生された組換えヒト骨誘導因子を単離、精製して調製した組換えヒト骨誘導因子(rhBMP)である。これらのヒト骨誘導因子(rhBMP)としては、例えば、rhBMP-2、rhBMP-3、rhBMP-4

(rhBMP-2Bともいう)、rhBMP-5、rhBMP-6、rhBMP-7、rhBMP-8、rhBMPのヘテロダイマー又はこれらの改変体や一部欠損体を挙げるることができる。これらのタンパク質を単独で又は2種以上の混合物として用いることができる。

【0009】これらのrhBMPは、哺乳動物細胞(例えば、CHO細胞)、微生物(例えば、大腸菌)又は酵母細胞等で発現したものであることができる。既に大量生産法及び精製法が確立しているrhBMPとしてはrhBMP-2があるが、その他のrhBMPを同様に製造し、精製して用いることができる[Progress in Growth Factor Research, Vol. 1, pp. 267-280 (1989)]。既に知られている精製rhBMP-2は、N末端アミノ酸配列が異なる複数の単量体からなる成熟ペプチドであって、分子量約30,000の二量体タンパク質である。それぞれの単量体は、Asn⁵⁶残基にハイマンノース型の糖鎖を有している[Abstract Sixth Interaction Symposium of the Protein Society, San Diego, CA (1992)]。

【0010】本発明で使用するこのできる二相性リン酸カルシウム(BCP)も特に限定されるものではないが、ヒドロキシアパタイトと β -トリカルシウムホスフェートとを合計で90重量%以上含むBCPは生体親和性が良好であり好ましい。ヒドロキシアパタイトは、本来的に良好な骨伝導能を有しているが、生体内では吸収されにくい。一方、 β -トリカルシウムホスフェートは、骨伝導能は低いが生体内で吸収される。従って、ヒドロキシアパタイトと β -トリカルシウムホスフェートとの構成比を変化させることにより、前記のとおり、BCPの骨伝導性と生体内吸収性とを適切に調節することができる。

【0011】本発明の移植体で用いるBCPは、ヒドロキシアパタイトの骨伝導性を維持しつつ、しかもBMPによって誘導される新生骨と良好に置換する程度の吸収性を有していることが好ましい。こうした好ましい特性を有するBCPでは、ヒドロキシアパタイト/ β -トリカルシウムホスフェート比(重量)が、50/50ないし10/90の範囲内にある。更に、ヒドロキシアパタイト/ β -トリカルシウムホスフェート重量比が約30/70以下になると移植されたBCPの大部分が生体内で吸収され、約20/80以下では完全に生体内で吸収されるので特に好ましい。前記の重量比が50/50を超えると新生骨内部のヒドロキシアパタイトの残留量が増加し、リモデリング等による骨吸収や感染症の原因となり、一方、10/90未満になるとヒドロキシアパタイトの骨伝導能が不十分となるので好ましくない。

【0012】BCPは、公知の方法で調製することができる(特公昭60-25383号、特公昭60-507

44号、特開平3-94761号、特開平3-137079号、特開平4-2355号、特開平5-117056号又は特開平5-161707号各公報)。例えば、ヒドロキシアパタイトと β -トリカルシウムホスフェートとを約1100~1200℃の焼成段階で混合させて調製する。

【0013】前記の方法により、BCPは、通常は多孔質顆粒体として調製される。この多孔質顆粒状BCPをそのまま本発明移植体の担体として用いることができる。顆粒状担体の大きさは特に制限されないが、移植体を調製及び移植する際の操作性や適応性の点から、好ましくは約5mm以下、より好ましくは100~1000 μ m、特に好ましくは400~600 μ mである。また、多孔質顆粒状担体の比表面積も特に制限されないが、BMPの担持効率や骨形成の場を提供する点から、好ましくは約0.3m²/g以上、より好ましくは0.5~1.0m²/g、特に好ましくは0.7~0.8m²/gである。

【0014】BCPを、所定の形状を有する多孔質ブロック状成形体として得ることもでき、この多孔質ブロック状成形体を本発明移植体の担体として用いることができる。多孔質ブロック状成形体は、公知の方法で、前記のヒドロキシアパタイトと β -トリカルシウムホスフェートとから焼成により直接成形するか、又は顆粒状BCPを再焼成して調製することができる。この多孔質ブロック状成形体は、調製時に形状を調整するだけでなく、成形後（特に、移植時）にも簡単に所望の形状に変えることができる。多孔質ブロック状成形体の大きさや形状は移植部位や移植目的に応じて適宜調整すればよい。また、比表面積も特に限定されないが、前記の多孔質顆粒体と同様の理由で、前記と同様の範囲であるのが好ましい。

【0015】前記のBCP担体にBMPを担持させて、本発明の移植体を調製する方法は特に制限されるものではなく、例えば、適当な液体中のBMP溶液（又は懸濁液）をBCP担体に浸漬、含浸、噴霧、塗布又は滴下等の方法により添加し、続いて、乾燥（好ましくは減圧又は凍結乾燥）して容易に所望の移植体を得ることができる。好適には減圧下に含浸させた後に凍結乾燥する。いずれの場合も、BMPの活性を失わせることなく、BCPの多孔質部分の全体にBMPをほぼ均一に分散させることのできる方法が好ましい。こうして、多孔質顆粒状担体からは多孔質顆粒状移植体を得ることができ、多孔質ブロック状担体からは多孔質ブロック状移植体を得ることができる。更に、前記の多孔質顆粒状移植体の一群を、生体内で数時間若しくは数日以内に迅速に分解する生体適合性の適当な容器、例えば、カプセル（例えば、ゼラチンカプセル、ソフトカプセル等）、袋状のシート（例えばゼラチン膜）に収納して、あるいは同様の生体分解性シート等に包んで、手術時の操作性に優れたパッ

ケージ移植体とすることもできる。

【0016】更に、本発明の移植体は、前記の多孔質顆粒状BCPにBMPを付与する前、後又は同時に増粘剤を加え、所望の形状に成形した固体、半固体、粘土状、ペースト状、又は高粘性流動体の凝集体であることもできる。増粘剤としては、生体適合性、安全性、及び好ましくは生体分解性を有し、顆粒状BCPと共に所望の凝集体を成形することのできるものである限り特に制限はないが、例えば、セルロース系高分子化合物、例えばヒドロキシプロピルメチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース又はカルボキシメチルセルロース；ポリ乳酸（PLA）、ポリグリコール酸（PLG）、又はこれらのコポリマー（PLGA）；ポリ乳酸（PLA）、ポリグリコール酸（PLG）又はこれらのコポリマー（PLGA）とポリエチレングリコール（PEG）とのコポリマー；ヒアルロン酸；アルギン酸；ゼラチン；フィブリン糊；又はコラーゲン等を挙げることができる。

【0017】前記の多孔質顆粒状担体に増粘剤を加える方法も特に制限されるものではなく、例えば、前記のBMPの担持方法と同様に、適当な液体中の増粘剤溶液（又は懸濁液）を担体に浸漬、含浸、噴霧、塗布又は滴下等の方法により添加し、続いて、乾燥（好ましくは減圧又は凍結乾燥）すればよい。好適には減圧下で含浸させた後に凍結乾燥する。いずれの場合も、BMPの活性を失わせることなく、BCPの多孔質部分の全体に増粘剤をほぼ均一に分散させることのできる方法が好ましい。こうして、本発明による凝集体状移植体を得ることができる。

【0018】移植体のBMPの担持量は、骨形成を引き起こすのに必要最小限のBMP濃度（最小骨形成発現濃度）より多ければよい。BMP濃度の増加にともなって骨形成量は増加するが、ある値以上では骨形成量はほぼ一定となる。一般にこの骨形成量は、移植体の大きさ（又は顆粒状移植体群の占める体積）にほぼ一致する。すなわち、過度に濃度を増加しても移植体の大きさ以上の骨は形成されない。

【0019】適当な濃度のBMPを含んだ移植体を埋植して形成される骨の大きさと形状は、移植体の大きさ及び形状に原則として依存する。従って、具体的な混合比やBMP濃度は、BCPの種類、形状、多孔性の程度、移植体の適用部位、好ましい骨形成速度等に応じて適宜決定することができる。例えば、顆粒状BCP担体とrhBMP-2を用いて本発明移植体を調製する場合に、rhBMP-2を1 μ g/形成すべき骨又は軟骨の容量1ml以上、好ましくは5~1、000 μ g/同1ml、より好ましくは10~300 μ g/同1mlの量で担持させるのが好ましい。

【0020】本発明の移植体は、前記以外の成分を含有することができる。それらの所望成分として、具体的には、安定化剤、保存剤、可溶化剤、pH調整剤又は増粘

剤等を挙げることができる。また、骨又は軟骨形成に有用な追加成分、例えば、リン酸カルシウム、ヒドロキシアパタイト等のミネラル成分、骨若しくは軟骨形成補助因子等の作用促進成分、フィブロネクチン、オステオネクチン、又は非抗原性のIBM（不溶性骨マトリックス）等を含むこともできる。これらの所望成分は、本発明移植体を製造する好適な段階で、適宜に好適な方法により添加することができる。

【0021】本発明の移植体は、使用時に調製されてもよく、あるいは調製後使用時まで適切な条件下で保存されてもよい。本発明の移植体は、各種の骨又は軟骨の欠損を修復するために、当該分野に知られた方法で、患部に移植することができる。すなわち、従来知られている移植体と同様に、生体に適用することができ、その目的、用途、適応部位、患者の状態等に応じて、当業者の常法に従って適宜適用することができる。

【0022】本発明の移植体は、前記のように形成される新生骨の形状を実質的に規定する。すなわち、その移植体の形状に対応して骨形成が生じる。具体的には、本発明移植体が埋植された部位において、移植体周囲に集まったマクロファージによりBCPが徐々に貪食吸収され、BMPにより誘導された新生骨に置換される。従って、骨形成を期待する形状に沿って、本発明の移植体を成形することが望ましい。また、本発明の移植体は、移植手術後の取り出し手術の必要がない。

【0023】本発明による前記の各種の移植体は、それを単独で用いるだけでなく、それらを任意に組み合わせ用いてもよい。また、本発明移植体と別の公知移植体とを組み合わせ用いてもよい。例えば、人工インプラント材料の周囲に、本発明による顆粒状移植体及び／又はブロック状移植体を付着させて移植することができる。特に歯科領域の適用においては、本発明による顆粒状移植体とGTR法の併用が効果的である。更に、人工歯根を埋植する際に、骨穿孔部との接触部に本発明移植体を付着させることも有効である。本発明移植体の局所への固定、形状の維持あるいは強度が十分でない場合には、他の公知の補強材を併用することもできる。補強材は、例えば、移植体を固定するための生体適合性の膜、例えばコラーゲン膜やGTR法に用いるゴアテックス膜又はポリ乳酸膜等、あるいは本発明移植体と生体内組織（特に骨）との固定具、例えば金属プレート、骨結合用ピン又は固定釘等であり、これらの補強材は、必要があれば、骨形成後に、外科的に取り除くこともできる。また、他の公知の移植体と併用して用いてもよい。

【0024】

【実施例】以下、実施例によって本発明を更に具体的に説明するが、これらは本発明の範囲を限定するものではない。

実施例1

(1) 移植体の調製

BCP担体としては、 β -トリカルシウムホスフェート80%とヒドロキシアパタイト20%とを焼成段階（焼成温度1150℃）で混合させて製造した顆粒状BCP（粒径：420～590 μ m；比重：3.1；比表面積：0.076m²/g；日本特殊陶業KK製）を用い、BMPとしては、山之内製薬より提供されたrhBMP-2のアルギニン（0.5M）/L-ヒスチジン（10mM）水溶液（pH6.5）を用いた。BCP顆粒約700 μ lを、rhBMP-2水溶液（rhBMP-2の配合量：50 μ g及び10 μ g）に減圧下で約1時間浸漬させた後、凍結乾燥を行い顆粒状移植体を得た。この2種類の移植体をゼラチンカプセルに入れて、移植試験実施時まで-20℃で保存した。

【0025】(2) 骨形成試験

Wistar系雄性ラット（7週齢）（各群5匹）の背部に皮膚切開を入れ、皮下の疎性結合組織内に、前記（1）で調製した移植体の入ったカプセルを移植埋入した。コントロールとしては、rhBMP-2を担持していないBCP顆粒のみを封入して含むカプセルを同様に移植した。移植から3週間経過後、背部皮膚を丁寧に剥離し、移植物を一塊として取り出し、直ちにホルマリン固定を行い、その後、X線撮影を行った。通法に従って脱灰パラフィン切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン染色を施して、光学顕微鏡にて観察した。

【0026】(3) 結果

rhBMP-2を50 μ g配合した移植体を埋植した群では5例全例において、骨様組織の形成が観察された。骨様組織のほとんどの場合は、細胞を中心に球状に形成された小さな骨様組織の集団と、その集団に連続した層板様構造を有する新生骨組織として観察された。この1例の顕微鏡写真を図1に示す。rhBMP-2を10 μ g配合した移植体を埋植した群では5例中1例において、一部のBCP顆粒中央部に上記と同様の骨様組織の形成が見られたが、他の4例においては明らかな骨様組織の形成は認められなかった。コントロール群においては、明らかな骨様組織の形成は認められず、BCP顆粒内に多数の細胞が、BCP顆粒周囲に多核の巨細胞が観察された。上記試験で、主に顆粒中央部に、小さな骨様組織の集団が観察され、その集団のいくつかに連続した顆粒間相当部に比較的分化した新生骨組織が観察されたことから、本発明の多孔質移植体を移植した場合、最初に小さな球形の骨様組織が移植体内部に形成され、その後、周囲にさらに分化した骨組織が形成されたと考えられる。上記の異所性骨誘導モデルにおいて、移植からわずか3週間で上記のような骨形成が観察され、しかも生体内で低炎症であることが確認された。従って、本発明移植体は、生体内で速やかに骨形成を誘導し、しかも新生骨に徐々に置換し、移植体の残存を完全に無くすかあるいは最小限に抑えることができ、良好な骨組織を形成することができ、しかも抗原性等の点で安全であること

が示された。なお、実施例1(1)で調製した顆粒状移植体を、歯周病によって生じた歯槽骨の欠損部に補填して適用することもできる。更に、GTR法を併用して前記の顆粒状移植体を固定してもよい。

【0027】実施例2

(1) 移植を行う骨欠損の形状に合わせて成形した円柱状の多孔質BCPブロックに、rhBMP-2のアルギニン(0.5M)-L-ヒスチジン(10mM)水溶液(pH6.5)を、rhBMP-2の100 μ g/BCPブロック1mlの量で減圧下に浸漬させ、続いて凍結乾燥を行い、ブロック状移植体を調製する。こうして得られたブロック状移植体を、骨欠損部に補填して適用することができ、更にこのブロック状移植体と残存骨とを金属プレートで固定してもよい。

(2) 実施例1(1)と同様のBCP顆粒に、rhBMP-2とアテロコラーゲンを含む水溶液を減圧下で浸漬させ、凍結乾燥を行い、顆粒状移植体を調製する。

(3) 実施例1(1)と同様のBCP顆粒に、rhBMP-2を含む水溶液を浸漬させ、乾燥させた後に、粘性のあるポリ乳酸(分子量650)-ポリエチレングリコール(分子量200)ブロック共重合体(PLA-PEG)を加えて、高粘性ゲル状移植体を調製する。

(4) PLA-PEGに代えてカルボキシメチルセルロースを用いること以外は前記実施例2(3)と同様の操作により、粘土状の移植体を調製する。

【0028】

【発明の効果】本発明移植体は、生体内で速やかに骨形成を誘導し、しかも新生骨に徐々に置換し、移植体の残存を完全に無くするかあるいは最小限に抑え、良好な骨組織を形成することができ、抗原性等の点で安全で、しかも適応時の操作性及び整形性にも優れている。従っ

て、外傷、疾病又は先天性の欠陥等によって引き起こされた各種の骨又は軟骨の欠損を修復するために、当該分野に知られた方法で患部に適用することができる。本発明移植体は生体内に移植された際に、起炎性が低く生体適合性に優れている。また、新生される骨と生体内の既存の骨との連続性も良好であり、自然に近い状態で骨又は軟骨の修復が可能になる。本発明移植体は、各種の分野に適用することができ、例えば、骨折等の外傷、腫瘍あるいは炎症性、変性ないし壊死性骨疾患等の疾患、脳外科あるいは整形外科手術等の手術に伴う採骨等による骨又は軟骨の欠損部位の修復、各種骨折の治癒促進、人工関節、人工骨若しくは人工歯根等の人工インプラント周囲での骨の形成、人工インプラント使用時の固着促進、脊椎固定促進、脚延長等の整形外科分野における骨の補填、軟骨の再生、関節の再建、形成外科分野での骨又は軟骨の補填、あるいは歯科領域での骨、軟骨又はセメント質の修復やインプラント使用のための骨の増大等に好適である。

【0029】本発明移植体のうち、顆粒状移植体及び凝集体移植体は、特に骨又は軟骨の小規模な欠損の修復、各種骨折の治癒促進、あるいは歯科領域における骨、軟骨又はセメント質の修復やインプラント使用のための骨の補充等、移植体の固定が容易な骨(軟骨)欠損に対して有用性が高い、一方、大規模な骨欠損、一定の強度を必要とする部位、あるいは特定の形状の維持が必要とされる部位における骨欠損に対しては、成形されたブロック状移植体を用いるのが有利である。

【図面の簡単な説明】

【図1】実施例1で実施した、rhBMP-2(50 μ g)配合移植体を埋植したラットにおける骨形成組織像を示す図面に代わる写真である。

【図1】

顔面代用写真



写真